# JP05184366A

# MicroPatent Report

## GENE DNA CODING ASPARTOKINASE AND ITS USE

[71] Applicant: MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD

[72] Inventors: FUGONO NOBUTAKE;

KOBAYASHI MIKI; KURUSU YASUROU; YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP04024658

[22] Filed: 19920114

[43] Published: 19930727

CHECOCKE TREMOCAL PROTECTED RETORING MENTROES AUXATION 44 MICHORE MICHIGANIC PROPERTY MICHIGAN MATERIAL STRUCKS IN PERSONAL CHARGEST CONTROLLE CONTROLLE CHARGEST INC. CONTRACTOR CONTRACTOR TRACTORIES ACTUATIONS ACCURATE TRACTORIES 260 STUDDENG CHATCHIC CEDUCINES CLOSERAN CENTRAGE THOUSAND INC OPERATED CONTRIBUTE TEXTERANC CENTERTYS TICLICION TOURISMES HIS STREETERS CALIFORNIA DRESSORIC RESURSTS CENTREDA GENERICADO (CD) MICHARITE CECUTICISE CACTURES CONTROLS CICLIAINE TOLICITICS OR TRUCTOCIC CHURCHIC TRATERICAL CACATTRICA COLLECTICA CONCERNO: 540 STATUTE CONCLUS RETAINS CHARGES MADE CITALINA SIG EDUCACIAN TRACACTOR TRACACTORAGE ATTENUAGE, MICHIGANET TRACACTORET 660 CONCLUDE ANGUNCACY TOXONICSC SUMMITTEE MANTERED CONCICTURE 120 STREETING CHINAGO TATATACA GAGAGAG SCOTTONE CONCEASE 198 DECIMENDS AUDICAND MICCEPATE CONTITION BENGENCE CONCERCE 346 ASSETTICE CONSTRUCT PERSONAL ABSAULTS SERVINES SCHOOLSE SEC RESERVED ASSESSMENT CHARACTER SERVED CONTINUE SCHOOLSE SEE CURRENCE ACCULTINAL CALIFORNIA OFFICIANCE ACTROMOSE SCREETING 1000 DICTIONAL PROCESSOR CONCIDENT SERVICES SOLICISCO CONSIDERY 1000 ACCORDER TORIDINE RESERVAT COMMUNE ACCORDATE CUTTICALE LLOS THE RESIDENCE OF THE PROPERTY CHECATORIC ACTROMET CONDUCCIA GOULANCES WARTILDED MODACORIS 1250

### Go to Fulltext

### [57] Abstract:

PURPOSE: To provide a new DNA useful for the production of L-lysine. CONSTITUTION: A gene DNA coding an aspartokinase (E.C.2.7. 2.4.) originated from coryneform group of bacteria, e.g. a gene DNA coding the aspartokinase expressed by the DNA base sequence of formula. It can be produced by cloning a microbial strain capable of producing aspartokinase.COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500



(19)日本国特許庁(JP)

# (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184366

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl.5

C 1 2 N 15/00

識別記号

庁内整理番号

A 8931-4B

FΙ

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数8(全27頁)

(21)出願番号

(22)出願日

特願平4-24658

平成 4年(1992) 1月14日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 畚野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波絡合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

**菱油化株式会社筑波総合研究所内** 

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 からアスパルトキナーゼをコードするDNAを単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このアスパルトキナーゼをコードする遺伝子 DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233株は、L-リジンの生成量が増加した。

### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がプレビバクテリウム・フ

ラバム (Brevibacterium flavum) MJ233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

【化1】

GTGCCCCTGG	TCGTACAGAA	ATATGGCGGT	TCCTCCCTTG	AGAGTGCGGA	ACGCATTAGA	60
AACGTCGCTG	AACGGATCGT	TGCCACCAAG	AAGGCTGGAA	ATAATGTCGT	CCTTCTCTCC	120
TCCGCAATGG	GAGACACCAC	GGATGAGCTT	CTAGAACTTG	CTGCGGCAGT	CAATCCCGTT	180
CCGCCAGCTC	GTGAAATGGA	TATGCTCCTG	ACTGCTGGTG	ACCCTATTTC	TAACGCTCTC	240
GTCGCCATGG	CTATTGAGTC	CCTGGGTGCA	GAGGCTCAAT	CTTTCACGGG	TTCTCAGGCT	300
GGTGTGCTCA	CCACCGAGCG	TCACGGAAAC	GCACQCATTG	TTGATGTCAC	TCCAGGTCGT	360
GTGCGTGAAG	CACTCGATGA	GGCCAAGATC	TGCATTGTTG	CTGGTTTCCA	GGGTGTCAAT	420
AAGGAAACCC	GCGATGTCAC	CACGTTGGGT	CCCCCTCCTT	CTGATACCAC	TGCAGTTGCA	480
TTGGCAGCTG	CTCTGAACGC	TGATGTGTGT	GAGATTTACT	CAGATGTTGA	CGGCGTGTAC	540
ACCCCTGACC	CCCCCATCCT	TCCTAATGCT	CAGAAGCTGG	AAAAGCTCAG	CTTCGAAGAA	600
ATGCTGGAAC	TTGCTGCTGT	TGGCTCCAAG	ATTTTGGTGC	TACGCAGTGT	TGAATACGCT	660
CCTCCATTCA	ATGTGCCACT	TCGCGTACGC	TOCTCTTATA	CCAATGATCC	CGGCACTTTG	720
ATTGCCGGCT	CTATGGAGGA	TATTCCTGTG	GAAGAAGCAG	TCCTTACCGG	TGTCGCAACC	780
GACAAGTCCG	AAGCCAAAGT	AACCGTTCTG	GGTATTTCCG	ATAAGCCAGG	CGAGGCTGCG	840
AAGGTTTTCC	CTCCCTTCCC	TGATGCAGAA	ATCAACATTG	ACATGGTTCT	GCAGAACGTC	900
TCCTCTGTCG	AAGACGGCAC	CACCGACATC	ACGTTCACCT	GCCCTCGCTC	TGACGGACGC	960
CGTGCGATGG	AGATCTTGAA	GAAGCTTCAG	GTTCAGGGCA	ACTGGACCAA	TGTGCTTTAC	1020
GACGACCAGG	TCGGCAAAGT	стесстест	GGTGCGGGCA	TGAAGTCTCA	CCCAGGTGTT	1080
ACCGCAGAGT	TCATGGAAGC	TCTCCCCGAT	GTCAACGTGA	ACATCGAATT	GATTTCCACC	1140
	GCATTTCCGT				•	
	AGTTCCAGCT					
000						

CCC

1263

で示されるアスパルトキナーゼ (E.C.2.7.2.4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

【化2】で示されるアスパルトキナーゼ (E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1~4のいずれかに記載の遺伝子 DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1~4のいずれかに記載の遺伝子 DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子 を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えブラスミドで形質 転換されたコリネ型細菌。

【請求項8】 グルコースを、請求項7記載のコリネ型 細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてLーリジン を生成せしめることを特徴とするLーリジンの製造法。 【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は、アスパルトキナーゼ

(E. C. 2. 7. 2. 4.) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるLーリジンの製造法に関する。

【0002】 Lーリジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

#### [0003]

【従来の技術】従来、Lーリジンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてLーリジンを製造する方法が知られている [例えば、特公昭51-21078号公報、特公昭53-1833号公報、特公昭62-8692号公報等参照]。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている [特開昭56-160997号公報、特開昭60-62994号公報、特開昭62-79788号公報等参照]。しかしながら、従来提案されている方法によるLーリジンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はLーリジンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、Lーリジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、アスパルトキナーゼ (E.C.2.7. 2.4.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・ コリ (Escherichia coli) 由来の遺伝子 [Journal of B iological Chemistry, 256, p10228~p10 230, 1981参照] がよく研究されている。また、 グラム陽性細菌由来のアスパルトキナーゼ (E.C.2. 7. 2. 4.) としては、バチルス・サチルス (Bacillus subtilis)、コリネバクテリウム・グルタミカム(Cory neform glutamicum) 等が知られている [Journal of Bi ological Chemistry, 262, p8787-p879 8, 1987; Molecular Microbiology, <u>5</u>, p119 7-p1204, 1991参照]。しかしながら、ブレ ビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) 由来のアスパルトキナーゼ (E.C.2.7.2.4.) をコ ードする遺伝子については従来の報告例は見当らない。 [0005]

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼ (E.C.2.7.2.4.)をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的に1ーリジンを製造することである。

#### [0006]

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的 を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色 体よりアスパルトキナーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を 適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を 形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いる と、効率的にLーリジンを製造しうることを見い出し本 発明を完成するに至った。

【0007】かくして本発明によれば、

- (1) コリネ型細菌由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA:
- (2) 該遺伝子DNAが導入された組換えブラスミド:
- (3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型 細菌;及び
- (4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてLーリジンを製造する方法が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0009】本発明の「アスパルトキナーゼをコードする遺伝子DNA」とは、Lーアスパラギン酸にリン酸を付加する酵素、すなわちアスパルトキナーゼ(E.C. 2.7.2.4.)をコードする遺伝子DNAを意味するものである。

【0010】アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(以下、これを「A断片」と略称することがある)は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はアスパルトキナーゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum) MJ233(FERM BP-1497)およびその由来株が有利に使用される。

【0011】これらの供給源徴生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである:A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0012】先ず、ブレビパクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばEcoRJを用いて染色体DNAを完全に分解する。

【0013】得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399(宝酒造製)に挿入し、このベクターを用いて、アスパルトキナーゼ遺伝子が欠損した大腸菌(エシェリヒア・コリ)変異株CGSC5074 [エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター (Escherichia coli Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、エールユニバーシィティ (Department of Biology, Yale University); P.O.Box 6666 New Haven、CT 06511-744、U.S.A. 保存菌株]を形質転換し、選択培地に塗抹すること

により、形質転換株を取得する。

【0014】得られる形質転換株よりプラスミドDNA を抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0015】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記アスパルトキナーゼが欠損した大腸菌変異株に導入し、選択培地に強抹する。

【0016】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブ

レビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来 のA断片を確認・取得することができる。

【0017】このようにして得られるA断片の一つは、上記プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRlの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素Nrulで切断することによって得られる大きさが約1.7kbのDNA断片を挙げることができる。

【0018】この約1.7kbのアスパルトキナーゼを コードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素 で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下 記表1に示す。

[0019]

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Dra I	1	0.2, 1.5
Hinc II	2	0.3, 0.6, 0.7
Hind III	1	0.4, 1.2

なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0020】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミ ドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合に は、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られ る分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での 泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリ ルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア ・コリのファイ・エックス174ファージ (øx174 phage) のDNAを制限酵素Hae Illで切断して 得られる分子虽既知のDNA断片の同一ポリアクリルア ミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切 断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを 算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの 大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさ の決定において、1 k b 以上の断片の大きさについて は、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果 を採用し、約0.1 k b から1 k b 未満の断片の大きさ については4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によっ て得られる結果を採用した。

【0021】一方、上記のブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素NruI-EcoRIによって切断することにより得られる大きさが

約1.7kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxychain termination 法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. A cad. Sci. USA, 74, p5463, 1977)により決定することができる。このようにして決定した上記約1.7kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアスバルトキナーゼをコードする遺伝子は、以下に示す配列を有するものであり、421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対から構成されている。

### [0022]

【化3】上記の塩基配列を包含する本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製 System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0023】また、前記の如くブレビバクテリウム・フラバムMJー233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アスパルトキナーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、立らに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0024】以上に詳述した大きさが約1.7kbのD NA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0025】本発明のアスパルトキナーゼをコードする 遺伝子を含むDNA断片(A断片)は、適当なプラスミ ド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機 能を司る遺伝子を少くとも含むプラスミドベクターに導 入することにより、コリネ型細菌内でアスパルトキナー ゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができ る。

【0026】また、本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アスパルトキナーゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0027】本発明のA断片を導入することができる、 コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少くと も含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3 -210184号公報に記載のプラスミドpCRY3 0;特開平2-276575号公報に記載のプラスミド pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pC RY31、pCRY3KE及びpCRY3KX:特開平 1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2 及びpCRY3;特開昭58-67679号公報に記載 のpAM330;特開昭58-77895号公報に記載 のpHM1519;特開昭58-192900号公報に 記載のpAJ655、pAJ611及UpAJ184 4;特開昭57-134500号に記載のpCG1;特 閉昭58-35197号公報に記載のpCG2;特開昭 57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG 11等を挙げることができる。

【0028】中でもコリネ型細菌の宿主ーベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0029】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレビバクテリウム・スタチオニス (Brevibacterium stationis) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出

す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製)のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0030】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0031】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0032】このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約1.7kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、Lーリジンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30ーAKと命名した。プラスミドpCRY30ーAKの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0033】このようにして造成されるアスパルトキナーゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてLーリジンを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0034】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主徴生物としては、コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11(FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11(FERM BP-1500)、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21(FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0035】なお、上記のFERM BP-1498の 菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株として DL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール資化性微生物である(特公昭59-28398号公 報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0036】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス(Brevibacterium ammoniagenes)ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;プレビバクテリウム・デバリカタム(Brevibacterium divaricatum)ATCC14020;プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(Brevibacterium lactofermentum)ATCC13869;コリネパクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0037】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p.361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0038】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50μg/ml)もしくはエチジウムプロミド(濃度:0.2~50μg/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0039】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki. K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照】、DNA受容菌へのパルス波通電 [Satoh, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照】によりプラスミドを導入することが可能である。

【0040】上記の方法で形質転換して得られるアスパルターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。

【0041】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通

常の栄養培地で行うことができ、炭素顔としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、廃糖蜜等が、そして窒素顔としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0042】培養は、通常、通気撹拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0043】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0044】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、レーリジン生成反応に使用することができる。

【0045】 Lーリジン生成反応においては、これらの 菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理 等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗 酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体 に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌 体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書 ではまとめて「菌体処理物」という。

【0046】しかして本発明に従えば、グルコースを、 上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、Lーリジン を生成せしめることからなるLーリジンの製造法が提供 される。

【0047】グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性媒体中において、好ましくは約20~約40℃、特に約25~約35℃において行なうことができる。

【0048】生成するL-リジンは例えば、高速液体クロマトグラフィー等の手段により反応液から分離回収することができる。

### [0049]

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施 例によりさらに具体的に説明する。

#### 【0050】実施例1

ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアス パルトキナーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片)のクローン化

(A) <u>プレビバクテリウム・フラバムM J - 233の</u> 全DNAの抽出 半合成培地A培地 [組成:尿素2g、(NH4)2SO47 g,  $K_2HPO_4$  0.5g,  $KH_2PO_4$  0.5g, MgS $O_4$  0.5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  6mg,  $MnSO_4$ 4~6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸 5 g、ビオチン200μg、塩酸チアミン200μg、 グルコース20g、蒸留水11] 11に、プレビバクテ リウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-14 97)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得 られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む 10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8. 0) -1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁し た。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100μg/m 1になるように添加し、37℃で1時間保温した。さら にドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になる ように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この 溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加 し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心 分離 (5,000×g、20分間、10~12℃) し、 上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるよ うに添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加え た。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス 棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾し た。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7. 5) -1mM EDTA・2Na溶液5mlを加え、4 ℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

### 【0051】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たブレビバクテリウム・フラバムM J −233の全DNA溶液の90μlを制限酵素EcoR I 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI分解DNAにクローニングベクターpHSG399(宝酒造より市販)を制限酵素EcoRIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl2及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

### 【0052】(C) <u>アスパルトキナーゼをコードする</u> 遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたアスパルトキナーゼ欠損大腸 菌変異株は、エシェリヒア・コリCGSC 5074 (thr A1101、lys C1001、met L 1000)である [() 内はアスパルトキナーゼ遺伝 子型 (Genotype)を示す]。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前 記エシェリヒア・コリCGSC5074株を形質転換 し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地[K 2HPO47g、KH2PO42g、(NH4)2SO41 g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g及 び寒天16gを蒸留水11に溶解] に途抹した。

【0053】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約3.8kbの挿入DNA断片が認められた。

【0054】本プラスミドをpHSG399-AKと命名した。

【0055】(D) <u>アスパルトキナーゼをコードする</u> <u>遺伝子を含むDNA断片(A) 断片のサブクローニング</u>上記(C) 項で得たプラスミドpHSG399-AKに含まれるDNA挿入断片を、必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpUC119(宝酒造より市販) ヘアスパルトキナーゼをコートする遺伝子を含むDNA 断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0056】上記(C)項で得たプラスミドpHSG399-AKを制限酵素EcoRI、NruIで切断したものと、プラスミドpUC119を制限酵素EcoRI、SmaIで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0057】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリCGSC 5074株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地  $[K_2HPO_47g,KH_2PO_42g,(NH_4)_2SO_41g,MgSO_4\cdot7H_2O0.1g,グルコース <math>20g$ 及び寒天16gを蒸留水11に溶解]に塗抹した。

【0058】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpUC119の長さ3.2kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0059】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

[0060]

【表2】

表2 プラスミドpUC119-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
BanH I	1	4.9
Bgl II	2	4. 2, 0. 6
Hind III	2	3.6、1.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpU C119-AKと命名した。

【0061】以上によりアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約1.7kbのDNA断片(EcoRI-BamHI断片)を得ることができた。

#### 【0062】実施例2

アスパルトキナーゼをコードする遺伝子の塩基配列の決 定

実施例1の (D) 項で得られたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含む長さが約1.7kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sahger, F. et al., Proc.Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0063】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、下記配列に示す塩基配列を有する421個のアミノ酸をコードする1263の塩基対より構成されていることが判明した。

[0064]

【化4】

# 実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクター p C R Y 3 0 の作成

## (A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地 [尿素2g、(NH4)2SO47g、K2HPO40.5g、KH2PO40.5g、MgSO40.5g、FeSO4・7H2O6mg、MnSO4・4~6H2O6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水11]11に、プレビバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20m

1に懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリーSDS液 [0.2N NaOH、1% (W/V) SDS] 40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 [5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0065】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0066】これに等量のフェノールークロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0067】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液 [トリス10mM、EDTA 1mM; HC1にてpH8.0に調整] 2m1に溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液 [5倍濃度のTE緩衝液100m1に塩化セシウム170gを溶解させた液] 15m1と10mg/m1エチジウムプロマイド溶液1m1を加えて、密度を1.392g/m1に合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0068】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のパンドとして見い出される。このパンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0069】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

### 【0070】(B) <u>プラスミドベクターpCRY30</u> の作成

プラスミドpHSG298 (宝酒造製) 0.5μgに制限酵素Sall (5units) を37℃1時間反応させ、

ブラスミドDNAを完全に分解した。

【0071】前記(A)項で調製したプラスミドpBY 503の2μgに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mMMgCl2、10mMジチオスレイトール、1mMATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル(宝酒造製)を形質転換した。

【0072】形質転換株は30μg/m1 (最終濃度)のカナマイシン、100μg/m1 (最終濃度)のIPTG (イソプロピルーβーDーチオガラクトピラノシド)100μg/m1 (最終濃度)のXーgal (5ープロモー4ークロロー3ーインドリルーβーDーガラクトピラノシド)を含むL培地 (トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水11、pH7.2)で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリーSDS法[T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照]により抽出した。

【0073】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。

【0074】次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRlにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRl部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

【0075】実施例4

プラスミド p C R Y 3 0 - A K の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpHSG399-AK 5μgを制限酵素EcoRI-NruIを各5units 用い、37℃で1時間反応させ分解したものと、BamHIリンカー(宝酒造より市販)1μ1を混合し、50mMトリス級衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl2およびT4 DNAリガーゼ1unit の各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0076】このDNAを制限酵業BamHI 3unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵業BamHI 1unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス級衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂およびT4 DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシエリヒア・コリCGSC5074株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地[K2HPO47g、KH2PO42g、(NH4)2SO41g、MgSO4・7H2O0.1g、グルコース20g及び寒天16gを蒸留水11に溶解]に塗抹した。

【0077】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ1.7kbの挿入DNA断片が認められた。

【0078】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0079】形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。

【0080】プレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミドpBY50 2除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで 培養し、ペニシリンGを1ユニット/m1になるように 添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌 体を集め、菌体を20mlのパルス用溶液(272mM Sucrose, 7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>; p H7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集 め、5mlのパルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細 胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μ1と を混合し、水中にて20分間静置した。 ジーンパルサー (バイオラド社製) を用いて、2500ボルト、25 u FDに設定し、パルスを印加後氷中に20分間静置し た。全量を3m1の前記A培地に移し30℃にて1時間 培養後、カナマイシン15 µ g/ml (最終濃度) を含 む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養し た。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。この プラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大き さを測定した。その結果を下記の表3に示す。

[0081]

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-AK

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6. 1.7
BamH1	1	10.4

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCR Y30-AKと命名した。

【0082】なお、プラスミドpCRY30-AKにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバムMJ233-AKは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年12月16日付で:微工研菌寄第12658)として寄託されている。

### 【0083】実施例5

プラスミドpCRY30-AKの安定性

前記のA培地100mlを500m!容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレビバクテリウム・フラバムM J233-AKを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植継し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0084】この結果、カナマイシン添加および無添加 培地に生育したコロニーは同数であること、さらに A培 地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

### 【0085】実施例6

### L-リジンの生産

培地(尿素 0.4%、硫酸アンモニウム 1.4%、KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O 2ppm、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2ppm、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 2ppm、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl 100μg/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%)100mlを500ml容三角フラスコに分注、減菌(滅菌後 pH7.0)した後プレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)MJ233-AK(FERM P-12658号)を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0086】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20ppm、MnSO<sub>4</sub>·4~6H<sub>2</sub>O 20ppm、ビオチン200μg/l、チアミン・HCl100μg/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを21容通気撹拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0087】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g/l;MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g/l;FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 20ppm;MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 20ppm;チアミン塩酸塩100μg/l;pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を21容通気撹拌槽に仕込み、グルコース9gを添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0088】反応終了後、遠心分離(4000 r p m、15分間、4℃)にて除菌した上清液中のLーリジンを定量した。その結果、上清液中のLーリジン生成量は、1.5 g/1であった。

【0089】この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂(H<sup>+</sup>型)のカラムに通してLーリジンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、Lーリジン画分を濃縮し、冷エタノールでLーリジンの結晶を折出させた。その結果、400mgのLーリジン結晶を得た。

【0090】また、比較例として、同様の条件にて、ブレビバクテリウム・フラバム(Brevibacterium flavum)MJ-233(FERM BP-1497)を培養し、同様の条件にて反応させた後上清液中のレーリジンを定量した。その結果、上清液液中のレーリジン生成量は0.6g/1であった。

[0091]

【化5】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアスパルトキナーゼをコードする遺伝 子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図。

【図2】大きさが約1.7kbの本発明DNA断片の塩

1 5 10 15  Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala 20 25 30  Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp 35 40 45  Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60  Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 145 150 155 160		Val	Ala	læu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
20 25 30  Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Net Gly Asp Thr Thr Asp 35 40 45  Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60  Glu Net Asp Net Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		1				5					10					15	
Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Net Gly Asp Thr Thr Asp  35		Glu	Årg	Ile	Årg	Asn	Yal	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Λla	Thr	Lys	Lys	Λla
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60  Glu Wet Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala					20					25					30		
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60  Glu Wet Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Gly	Asn	Asn	Val	Val	Yal	Val	Cys	Ser	Ala	Net	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
Glu Net Asp Net Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg I le Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Net Ala I le Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  I le Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys I le Cys I le Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala				35					40					45			
Glu Net Asp Net Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80  Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Мlа	Ala	Ala	Va1	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg
Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  85  90  95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  100  105  110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  115  120  125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  130  135  140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			50					55					60				
Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  85  90  95  Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  100  105  110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  115  120  125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  130  135  140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Glu	Ket	Asp	Net	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		65					70					<b>7</b> 5					80
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Val	Ala	Net	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	G1n	Ser	Phe	Thr
100 105 110  Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125  Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala						85					90					95	
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  115 120 125 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Gly	Ser	G1n	Ala	Gly	Val	leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala					100					105					110		
Lys IIe Cys IIe Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140  Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		He	Val	Åsp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Årg	Glu	Ala	Leu	Лsp	Glu	Gly
130 135 140 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala				115					120					125			
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		Lys	He	Cys	Ile	Val	Ala	G1y	Phe	Gln	Gly	<b>V</b> al	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg
444			130					135					140				
145 150 155 160		Аsр	Va1	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala
【化2その2】	【化2その2】	145					150					155					160

	Leu	Ala	Ma	Ala	Leu	Λsn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	He	Tyr	Ser	Asp	Val
					165					170					175	
	۸sp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	He	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys
				175					180					185		
	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Net	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
			190					195					200	•		
	Ser	Lys	He	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	G1u	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn
		205					210					215				
	Val	Pro	Leu	Årg	Val	Årg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu
	220					225					230					235
	Ile	Ala	Gly	Ser	Ket	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Yal	Leu	Thr
					240					245					250	
	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
				255					260					265		
	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	٨rg	Ala	Leu	Ala	Asp
			270					275					280			
	Ala	Glu	Ile	Asn	I1e	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu
		285					290					295				
	Аsp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Årg	Ser	Asp	Gly	Årg
	300					305					310					315
【化2その3】																

-12-

Arg Ala Net Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Net Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Net Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr 

Ala Gly Thr Gly Arg

【化3その1】

### [配列]

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala 1 5 10 GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala 25 20 30 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Wet Gly Asp Thr Thr Asp 35 40 45 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT COC GTT CCG CCA GCT CGT Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC

GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC

Glu Met Asp Net Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu

65 70 75 80

GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG

Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr

85 90 95

GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC [1123702]

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg Ilis Gly Asn Ala Arg 110 105 ATT CTT GAT CTC ACT CCA GCT CCT GTG CCT GAA GCA CTC GAT GAG GGC Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC COC Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140 GAT GTC ACC ACG TIG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 150 155 145 160 TIG GCA GCT GCT CIG AAC GCT GAT GIG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 170 165 175 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 175 180 185 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC

-15-

【化3その3】

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Net Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 190 195 200 TCC ANG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 205 210 215 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 220 225 230 235 ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC lle Ala Gly Ser Net Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 240 245 250 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 255 260 265 TCC GAT AAG OCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 270 275 280 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA Ala Glu Ile Asn Ile Asp Net Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu 285 290 295

【化3その4】

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg 300 305 310 315 CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr 320 325 330 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala 335 340 345 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG Gly Wet Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Wet Glu Ala Leu 350 355 360 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC CGC Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg 365 370 375 ATT TOO GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala 380 385 390 400 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT 【化3その5】 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr 405 410 415 GCA GGC ACC GGA CGC

【化4その1】

Ala Gly Thr Gly Arg

420

## [配列]

CTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala 1 5 10 15 GAA CGC ATT AGA AAC GTC OCT GAA CGG ATC GTT GCC AOC AAG AAG GCT Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala 25 20 30 GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT Gly Asn Asn Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp 40 35 45 CAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT Clu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 60 55 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC

【化4その2】

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125 AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 145 150 155 160 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 165 170 175 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 175 180 185 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Net Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 190 195 200

【化4その3】

TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT Ser Lys 11e Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 205 210 215 CTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 220 225 230 235 ATT CCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC Ile Ala Gly Ser Net Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 240 245 250 GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 255 260 265 TOO GAT AAG COA GGO GAG GOT GOG AAG GTT TTC CGT GOG TTG GOT GAT Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 270 275 280 CCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA Ala Glu lle Asn lle Asp Net Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu 285 290 295

GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC [(£4 $\pm$ 0.4]]

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg 305 310 315 300 CCT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr 320 325 330 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GOC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala 335 340 345 GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG Gly Net Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Net Glu Ala Leu 350 355 360 CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg 365 370 375 ATT TOO GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala 380 385 390 400 CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGA GAC GAA GCC GTC GTT TAT Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr 405 410 415 【化5その1】

GCA GGC ACC GGA CGC

【化4その5】

Ala Gly Thr Gly Arg

420

配列番号:1

配列の長さ:1263

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム

株名: NJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置:1-1263

特徴を決定した方法:P

配列

GTG GCC CTG GTC GTA CAG AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala

1

5

10

15

GAA CGC ATT AGA AAC GTC GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala

20

25

30

【化5その2】

GGA AAT AAT GTC GTG GTT GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT Gly Asn Asn Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp 35 45 GAG CTT CTA GAA CTT GCT GCG GCA GTG AAT COC GTT CCG CCA GCT CGT Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg 50 55 60 GAA ATG GAT ATG CTC CTG ACT GCT GUT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC Glu Het Asp Het Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu 65 70 75 80 GTC GCC ATG GCT ATT GAG TCC CTG GGT GCA GAG GCT CAA TCT TTC ACG Val Ala Net Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr 85 90 95 GGT TCT CAG GCT GGT GTG CTC ACC ACC GAG CGT CAC GGA AAC GCA CGC Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg 100 105 110 ATT GTT GAT GTC ACT CCA GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly 115 120 125

AAG ATC TGC ATT GTT GCT GGT TTC CAG GGT GTC AAT AAG GAA ACC CGC [1165-603]

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg 130 135 140 GAT GTC ACC ACG TTG GGT CGC GGT GGT TCT GAT ACC ACT GCA GTT GCA Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala 145 150 155 TTG GCA GCT GCT CTG AAC GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCA GAT GTT Leu Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val 165 170 175 GAC GGC GTG TAC ACC GCT GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCT CAG AAG Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys 175 180 185 CTG GAA AAG CTC AGC TTC GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Net Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly 190 195 200 TCC AAG ATT TTG GTG CTA CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn 205 210 215 GTG CCA CTT CGC GTA CGC TCG TCT TAT AGC AAT GAT CCC GGC ACT TTG Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu 225 220 230 235

【化5その4】

ATT GCC GGC TCT ATG GAG GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC lic Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr 250 240 245 GCT GTC GCA ACC GAC AAG TOC GAA GOC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile 255 260 265 TOC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCG AAG GTT TTC CGT GOG TTG GCT GAT Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp 270 275 280 GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT CTG CAG AAC GTC TOC TCT GTG GAA Ala Glu Ile Asn Ile Asp Net Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu 285 290 295 GAC GOC ACC ACC GAC ATC ACG TTC ACC TGC CCT CGC TCT GAC GGA CGC Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg 300 305 310 315 CCT CCC ATC GAG ATC TTG AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC Arg Ala Net Glu lle Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr 320 325 330 AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCG

【化5その5】

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala

335

340

345

GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG Gly Net Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Net Glu Ala Leu

350

355

360

CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu lle Ser Thr Ser Glu Ile Arg

365

370

375

ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA

11e Ser Val Leu I1e Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala

380 385 390 400

CTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr

405

410

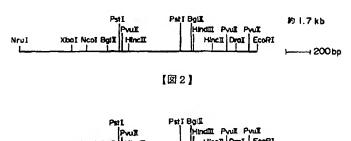
415

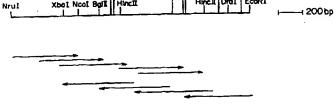
GCA GGC ACC GGA CGC

Ala Gly Thr Gly Arg

420

【図1】





# フロントページの続き